

30. 9. 2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 18 NOV 2004

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 4 年   7 月 2 7 日  
Date of Application:

出 願 番 号      特 願 2 0 0 4 - 2 1 8 7 8 6  
Application Number:  
[ST. 10/C] :      [ J P 2 0 0 4 - 2 1 8 7 8 6 ]

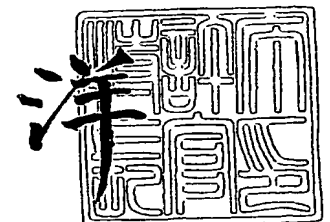
出   願   人      雪印乳業株式会社  
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 1 月   5 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



出 証 番 号    出 証 特 2 0 0 4 - 3 1 0 0 0 4 4

【書類名】 特許願  
【あて先】 特許庁長官 小川 洋 殿  
【国際特許分類】 A61K 38/00  
【発明者】  
    【住所又は居所】 埼玉県所沢市東新井町 2 8 7 - 2 0  
    【氏名】 元賣 陸美  
【発明者】  
    【住所又は居所】 埼玉県川越市三光町 6 - 2 グリンパレス 3 0 2  
    【氏名】 森田 如一  
【発明者】  
    【住所又は居所】 埼玉県川越市大袋新田 1 0 2 - 2 1  
    【氏名】 松山 博昭  
【発明者】  
    【住所又は居所】 埼玉県川越市南台 3 - 4 - 1 - 7 0 4  
    【氏名】 芹澤 篤  
【発明者】  
    【住所又は居所】 埼玉県川越市藤間 2 0 4 - 5  
    【氏名】 川上 浩  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000006699  
    【氏名又は名称】 雪印乳業株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100090941  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 藤野 清也  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 014834  
    【納付金額】 16,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

補体第4成分及び／又は  $\beta$  デフェンシンを有効成分とする骨形成促進剤。

【請求項 2】

補体第4成分及び／又は  $\beta$  デフェンシンを配合した骨形成促進用飲食品、医薬又は飼料

。

【書類名】明細書

【発明の名称】骨形成促進剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、補体第4成分及び／又は $\beta$ デフェンシンを有効成分とする骨形成促進剤に関するものである。また、本発明は、補体第4成分及び／又は $\beta$ デフェンシンを配合した骨形成促進用飲食品、医薬又は飼料に関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、高齢化に伴い、骨粗鬆症、骨折、腰痛等の各種骨疾患が増加する傾向にある。骨組織においては、絶えず骨形成と骨吸収が営まれており、若い時には骨形成と骨吸収のバランスが保たれているが、加齢に伴い種々の原因でそのバランスが骨吸収に傾く（アンカッピング）。そして、この状態が長期間続くと骨組織が脆くなり、骨粗鬆症、骨折、腰痛等の各種骨疾患を生じることになる。このアンカッピングを防止することができれば、骨粗鬆症、骨折、腰痛等の各種骨疾患を予防することができると考えられている。

【0003】

従来、アンカッピングを防止し、各種骨疾患を予防あるいは治療する方法として、（1）食餌によるカルシウム補給、（2）軽い運動、（3）日光浴、（4）薬物治療等が行われている。食餌によるカルシウム補給には、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム等のカルシウム塩や卵殻、魚骨粉等の天然カルシウム剤が使用されている。しかし、これらは必ずしも経口摂取に適している素材であるとはいえない。軽い運動はジョギングや散歩等が良いとされるが、体が弱っている場合は軽い運動も厄介なものであり、まして寝たきりの老人では殆ど運動できない。日光浴は活性化ビタミンD3の補給という点では良いとされているが、これだけでは不十分である。薬物投与には、 $1\alpha$ -ヒドロキシビタミンD3やカルシトニン製剤等が使用されており、骨粗鬆症の治療には有効であるということが知られている。しかし、これらの物質は医薬そのものであり、食品素材として使用可能なものではない。

【0004】

本発明者らは、食品素材として使用可能な骨形成促進作用や骨吸収抑制作用を有する物質を得るために、乳中に存在する骨形成促進因子及び骨吸収抑制因子を探索し続けてきた。本発明者らは、その過程において、補体第4成分及び $\beta$ デフェンシンが骨芽細胞の分化を促進することによって、骨形成促進作用を有することを見出した。骨芽細胞は骨形成で中心的な役割を果たしている細胞で、骨組織表面に存在し、骨基質タンパク質を分泌している。この骨基質タンパク質にリン酸カルシウムの結晶が沈着し硬い骨組織が出来上がる。

【0005】

一方、破骨細胞は造血幹細胞から発生し、海綿骨表面に存在し、骨を溶解する細胞である。破骨細胞が骨基質を溶解し（骨吸収）、その後、骨芽細胞が骨基質を合成することによって、骨の形成や成長（モデリング）、代謝（リモデリング）が起こると考えられている。本願発明は、補体第4成分及び／又は $\beta$ デフェンシンが、この骨代謝において骨形成で中心的な役割を果たしている骨芽細胞の分化を促進することによって、骨形成促進作用を有することを見出したものである。

【0006】

補体第4成分（Complement component C4）は血清中にあり、抗原抗体複合物と反応して活性化され、複雑な反応を起こしながら生理活性を発揮する酵素様物質である。補体第4成分自体では抗原に対する特異性は持たないが、抗原抗体複合物により活性化され、貪食作用の亢進を起こしたり、特異抗体の結合した細胞や細菌を破壊したりする。現在、補体第1成分（C1）から補体第9成分（C9）まで9つの成分が知られている。補体第4成分は、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖、 $\gamma$ 鎖という3種類のポリペプチド鎖からなる分子量210 kDaのタンパク質である。補体第3成分を有効成分として含有する胚・胎児及びそれらの組織培養用栄養因子

組成物や不妊症治療用組成物は公開されているが（例えば、特許文献1参照。）、補体第4成分が骨芽細胞の分化を促進することに関しては知られていなかった。

#### 【0007】

デフェンシンは、分子内に3つのS-S結合をもつ強い塩基性の抗菌ペプチドとして知られており、アルギニン残基が4～10個、システイン残基が6個ある29～34個のアミノ酸からなる塩基性のタンパク質である。システイン残基の存在位置の違いから、大きく $\alpha$ 型と $\beta$ 型に分けられる。グラム陽性細菌およびグラム陰性細菌に対する抗菌活性だけではなく、カビやウイルスに対しても抗菌活性を保有する。 $\beta$ デフェンシンは、呼吸器系上皮細胞や粘膜上皮細胞で発現しており、ヒトにおいては6つのタイプが知られている。デフェンシンには、抗菌作用のほか、正常細胞や癌細胞に対する細胞傷害作用、肥満細胞からのヒスタミン放出作用、単球走化作用など広く生体防御に関係していることが知られている。酵母と乳酸菌の特定の培養液濾液を投与してデフェンシン等を分泌させることからなるレトロウィルス感染症治療薬（例えば、特許文献2参照。）や、皮膚におけるデフェンシンの発現を刺激するヨモギの根からなる化粧用組成物などが公開されている（例えば、特許文献3参照。）が、骨芽細胞の分化を促進することに関しては知られていなかった。

【特許文献1】特開平10-033164号公報

【特許文献2】特開2004-115497号公報

【特許文献3】特開2004-067660号公報

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0008】

骨粗鬆症、骨折、腰痛等の各種骨疾患の性質上、日常の食事の中で、嗜好的にも問題なく、長期的・直接的に経口摂取することができ、また、直接的に骨形成促進作用を骨に付与し、骨粗鬆症、骨折、腰痛等の各種骨疾患の予防又は改善治療効果が期待できるような、新規な骨形成促進剤及び骨形成促進用飲食品、医薬又は飼料を提供することを課題とする。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0009】

本発明者らは、骨形成促進作用及び骨吸収防止作用を有する物質を探索している過程で、補体第4成分及び／又は $\beta$ デフェンシンが骨芽細胞の分化を促進することによって、骨形成促進作用を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

骨はカルシウムやミネラルなどの骨塩と、コラーゲンなどの骨基質からなる。骨を丈夫にするためには、骨密度などの指標で評価される骨塩量だけではなく、しなやかで弾力性のある骨のもとになる骨基質の形成が重要である。コラーゲンは分化した骨芽細胞によって産生されるので、骨芽細胞によるコラーゲンの産生促進は骨基質の形成につながり、骨基質が形成されることにより骨強度の上昇をもたらすことができる。

したがって、本発明は、補体第4成分及び／又は $\beta$ デフェンシンを有効成分とする新規な骨形成促進剤を提供することにある。また、本発明は、補体第4成分及び／又は $\beta$ デフェンシンを配合して骨形成促進作用を賦与した飲食品、医薬品又は飼料を提供することにある。

補体第4成分及び／又は $\beta$ デフェンシンは、血液あるいは乳から調製することができる。補体第4成分は市販の製品もあり、シグマ（Sigma）社等から販売されている。また、 $\beta$ デフェンシンも市販の製品があり、株式会社ペプチド研究所等から販売されている。

#### 【発明の効果】

#### 【0010】

本発明の補体第4成分及び／又は $\beta$ デフェンシンを有効成分とする骨形成促進剤、そして補体第4成分及び／又は $\beta$ デフェンシンを配合した骨形成促進用飲食品、医薬、飼料等は、骨芽細胞の分化を促進することによって、骨形成促進作用を有し、また骨粗鬆症、骨折、腰痛等の各種骨疾患の予防や改善に有用である。また、本発明の骨形成促進剤及び骨形成促進用飲食品、医薬、飼料等は、原料の入手が容易であり、常に一定の品質が得られ

、複雑な工程を必要としないで安価に製造でき、また大量調製することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明の骨形成促進剤を投与するに際しては、補体第4成分及び／又は $\beta$ デフェンシンを、必要に応じ、常法に従い、乳糖、澱粉等で賦型して、粉末剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤としたり、あるいはドリンク剤等として製剤化して用いることもできる。さらには、この補体第4成分及び／又は $\beta$ デフェンシンを、牛乳、乳飲料、コーヒー飲料、ジュース、ゼリー、ビスケット、パン、麺、ソーセージ等の飲食品に配合して、骨芽細胞の分化を促進することによって、骨形成促進を図ることも可能である。さらに、塩化カルシウム、炭酸カルシウム、乳酸カルシウム、卵殻、牛乳由来のカルシウム等の吸収性が良好なカルシウム剤を併用することにより、骨形成促進作用を一層高めることができる。また、これらの有効成分を飼料に含有させて、家畜や家禽等の骨形成を促進させることもできる。

【0012】

骨形成促進効果を得るためには、本発明の骨形成促進剤及び骨形成促進用飲食品の有効量として、成人において補体第4成分及び／又は $\beta$ デフェンシン1ng~100mgを1日に数回に分けて経口的に摂取すればよい。

このように、本発明の骨形成促進剤及び骨形成促進用飲食品、医薬を摂取することにより、骨芽細胞の分化を促進して骨形成が促進され、骨粗鬆症等の各種骨疾患を予防又は改善することができる。なお、補体第4成分及び $\beta$ デフェンシンは、元来、血液あるいは乳由来の成分であり、ラットにおける急性毒性は認められなかった。

以下に実施例及び試験例を示し、本発明についてより詳細に説明するが、これらは単に例示するのみであり、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

【試験例1】

【0013】

補体第4成分及び $\beta$ デフェンシンの骨芽細胞分化促進作用を調べた。すなわち、ヒト由来前骨芽細胞MG63細胞を、10%牛胎児血清を含むDMEM培地(Flow Laboratories社製)を用いて、 $2 \times 10^4$ /mlの細胞数で96穴プレートに播種し、5%CO<sub>2</sub>存在下、37℃で4日間培養し、試験用培養細胞とした。そして、培地に1%牛胎児血清を含む培地に交換し、補体第4成分(Complement C4, C8195、シグマ社製)を最終濃度0.1、1、及び10 $\mu$ g/mlとなるように、また、 $\beta$ デフェンシン( $\beta$ デフェンシン1及び2、株式会社ペプチド研究所製)を最終濃度0.1、1、及び10 $\mu$ g/mlとなるように培地に添加して、37℃で5日間培養した。培養上清を回収し、Procollagen Type I C-peptide EIA Kit (Takara MK101、宝酒造社製)にて培養上清中のI型コラーゲン量を測定することにより骨芽細胞分化促進活性を調べた。コントロールとして、補体第4成分及び $\beta$ デフェンシンが無添加のものを用了。コラーゲン産生量は、コントロールのI型コラーゲン測定量に対するそれぞれのサンプルのI型コラーゲン測定量の割合(%)で表した。その結果を表1に示す。

【0014】

〔表1〕

	最終濃度 ( $\mu$ g/ml)	コラーゲン産生量 (%)
コントロール (無添加)	—	100 $\pm$ 6
補体第4成分	0.1	138 $\pm$ 7
	1	169 $\pm$ 15
	10	161 $\pm$ 9
	10	161 $\pm$ 9
$\beta$ デフェンシン1	0.1	127 $\pm$ 11
	1	183 $\pm$ 9
	10	197 $\pm$ 18
$\beta$ デフェンシン2	0.1	134 $\pm$ 9

1  
10147±5  
177±14

## 【0015】

補体第4成分及び $\beta$ デフェンシンを添加した群はいずれもコントロール（補体第4成分及び $\beta$ デフェンシン無添加）群に比べI型コラーゲン量が増加しており、骨芽細胞分化促進作用を有することが判った。

## 【実施例1】

## 【0016】

（補体第4成分及び $\beta$ デフェンシンの製造）

ファルマシア社製S-Sepharose カラムに脱脂した牛乳10 lを通液した後、20mMリン酸緩衝液（pH7）で十分洗浄した。1.5M食塩を含むリン酸緩衝液（pH8.5）の比率を、1時間で100%まで上昇させながら吸着しているタンパク質をグラジエント溶出し、溶出時間15分の位置で補体第4成分0.5mgを、20分の位置で $\beta$ デフェンシン0.3mgを回収した。

このようにして得られた補体第4成分及び $\beta$ デフェンシンは、そのまま骨形成促進剤として使用可能である。

## 【実施例2】

## 【0017】

（骨形成促進剤の製造）

補体第4成分（Complement C4, C8195、シグマ社製）1mgに、含水結晶ぶどう糖93.4g、炭酸カルシウム5g、シュガーエステル1g、香料0.5gを加え、混和した後、タブレット状に打錠して、本発明の骨形成促進剤を製造した。

## 【実施例3】

## 【0018】

（骨形成促進剤の製造）

$\beta$ デフェンシン（ $\beta$ -Defensin-1,4337-s、株式会社ペプチド研究所製）1mgに、含水結晶ぶどう糖 93.4g、炭酸カルシウム5g、シュガーエステル1g、香料0.5gを加え、混和した後、タブレット状に打錠して、本発明の骨形成促進剤を製造した。

## 【実施例4】

## 【0019】

（骨形成促進剤の製造）

補体第4成分（Complement C4, C8195、シグマ社製）1 mg、 $\beta$ デフェンシン（ $\beta$ -Defensin-2, 4338-s、株式会社ペプチド研究所製）1mgに、含水結晶ぶどう糖 93.4g、炭酸カルシウム5g、シュガーエステル1g、香料0.5gを加え、混和した後、タブレット状に打錠して、本発明の骨形成促進剤を製造した。

## 【実施例5】

## 【0020】

（骨形成促進用乳飲料の製造）

生乳を、均質圧力120kg/cm<sup>2</sup>でホモゲナイズした後、75℃で15秒間加熱殺菌した生乳に、補体第4成分（Complement C4, C8195、シグマ社製）を、1 l当たり10mgとなるように無菌下で添加し、100 ml容量のガラス瓶に充填して骨形成促進用乳飲料を製造した。

## 【実施例6】

## 【0021】

（骨形成促進用乳飲料の製造）

生乳を、均質圧力120kg/cm<sup>2</sup>でホモゲナイズした後、75℃で15秒間加熱殺菌した生乳に、 $\beta$ デフェンシン（ $\beta$ -Defensin-1,4337-s、株式会社ペプチド研究所製）を、1 l当たり10mgとなるように無菌下で添加し、100 ml容量のガラス瓶に充填して骨形成促進用乳飲料を製造した。

## 【実施例7】

## 【0022】

(骨形成促進用ゼリーの製造)

果糖 20.0 (重量%)、グラニュー糖 15.0 (重量%)、水飴 5.0 (重量%)、寒天 1.0 (重量%)、香料 0.11 (重量%)、カルシウム 0.1 (重量%)、水 58.39 (重量%) の割合で原料を混合して、加熱滅菌した後、補体第4成分 (Complement C4, C8195、シグマ社製) を、1 l 当たり 10mg となるように無菌下で添加して容器に充填し、骨形成促進用ゼリーを製造した。

【実施例 8】

【0023】

(骨形成促進用乳児用調製粉乳の製造)

脱脂乳 75.61 (重量%)、乳清タンパク質濃縮物 2.36 (重量%)、乳糖 13.86 (重量%)、ミネラル混合物 0.32 (重量%)、水溶性ビタミン混合物 0.32 (重量%)、脂溶性ビタミンを含む脂肪 7.53 (重量%) の割合で原料を混合して殺菌した後、濃縮し、噴霧乾燥して調製粉乳原料粉を製造した。これに、 $\beta$ デフェンシン ( $\beta$ -Defensin-2, 4338-s、株式会社ペプチド研究所製) を、1 kg 当たり 10mg となるように無菌下で添加、混合し、骨形成促進用乳児用調製粉乳を製造した。

【実施例 9】

【0024】

(骨形成促進用ドッグフードの製造)

大豆粕 12.0 (重量%)、脱脂粉乳 14.0 (重量%)、大豆油 4.0 (重量%)、コーン油 2.0 (重量%)、パーム油 28.0 (重量%)、トウモロコシ澱粉 15.0 (重量%)、小麦粉 9.0 (重量%)、ふすま 2.0 (重量%)、ビタミン混合物 9.0 (重量%)、ミネラル混合物 2.0 (重量%)、セルロース 3.0 (重量%) の割合で原料を混合して殺菌し冷却後、補体第4成分 (Complement C4, C8195、シグマ社製) を、1 l 当たり 10mg となるように無菌下で添加して成型し、骨形成促進用イヌ飼育用飼料 (ドッグフード) を製造した。



## 【書類名】 要約書

## 【要約】

【課題】 骨芽細胞の分化を促進することによって、骨形成を促進する骨形成促進剤及び骨形成促進用飲食品、医薬、飼料の提供。

【解決手段】 補体第4成分及び／又は $\beta$ デフェンシンを有効成分とする、骨芽細胞の分化を促進することによって骨形成を促進する骨形成促進剤、また、補体第4成分及び／又は $\beta$ デフェンシンを配合した骨形成促進用飲食品、医薬、飼料。

【選択図】 なし

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2004-218786
受付番号	50401261874
書類名	特許願
担当官	林 圭輔 9868
作成日	平成16年 8月 2日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

【提出日】	平成16年 7月27日
-------	-------------

特願 2004-218786

出願人履歴情報

識別番号

[000006699]

1. 変更年月日

1990年 8月28日

[変更理由]

新規登録

住所

北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

氏名

雪印乳業株式会社